

JP62244382A

MicroPatent Report**TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN****[71] Applicant:** AJINOMOTO CO INC**[72] Inventors:** MATSUI KAZUHIKO;  
SANO TAKANOSUKE;  
MIWA KIYOSHI;  
OTSUBO EIICHI**[21] Application No.:** JP61087600**[22] Filed:** 19860416**[43] Published:** 19871024**Go to Fulltext****[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

**CONSTITUTION:** A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of *Brevibacterium lactofermentum*, etc., of the genus *Brevibacterium* is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RNA, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium. **COPYRIGHT:** (C)1987,JPO&Japio

**[51] Int'l Class:** C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322  
C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑯ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭62-244382

⑯ Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑯ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00  
C 07 H 21/04  
C 07 K 13/00  
C 12 P 13/22

7115-4B  
7138-4C  
8318-4H

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑯ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法及びトリプトファンの製造法

⑯ 特願 昭61-87600

⑯ 出願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」により発表

⑯ 発明者 松井 和彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑯ 発明者 佐野 孝之輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑯ 発明者 三輪 清志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内  
⑯ 発明者 大坪 栄一 東京都文京区西片1-13-6  
⑯ 出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) m-RNA の合成をコントロールするオペレーター領域、m-RNA の合成をコントロールするプロモーター領域、m-RNA の合成をコントロールするアテニュエーター領域、蛋白合成に必要なリボソームとm-RNA との結合領域、リーダーペプチドをコードする領域、トリプトファン合成系の酵素群をコードする領域及び最後にm-RNA の合成を停止させるシグナルを形成するターミネーター領域が含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCCGTTTGTG GGCATTGTC TCCCTGAGCT GCGTAAATCC CAGGAATTGT CGGATATGGC GCACCGTGTG CCGGGCCCT TGTGGCTGCT GTGGGACTT  
 GGGCCAAACAC CGGTAAAGCAC AGGGACTCCA CCCATTAGG GTTCTTAACA CCCTATACCG CGTGGCACAG CGACCGGGCA ACACCCACCA CAGCCCTCAA  
 TCCCTGTTA TTGCTCGCT ACTTGGCTT GTGGCCTCT GTTGGATGT GCGTGGCTGT GCGATTGGGT GTTGTGGCTG CCATCGTGTG CATTGGCATG  
 AGGAACAAAT AACCGAGGCA TCAACGCAA CACCGAAGA CCAACCTACA CGGACCCAGCA CGTAAACCCA CAACACGGAC GTIAGGACAA GTACCGTAC  
 CGTGGGGTA TGGCTCGCA TACTGTTGGC ATGGGTGATG CGAACCCAGT CGCGAAACCC CGCAGGGCC TGTTCGGCT GAAATTGAAG AGGAGGGCC  
 CGACGCCAT ACCGACGCCGT ATGACAAACG TACCAACTAC GCTTGGCTCA GCGCTTGGG CGTGGGGCCG ACAAAGGCGA CTTAACTTC TCCCTGGCC  
 TGUTGTAAT ATTACCTCCC CGATTATCAA CAGACTCGG CTGAATGCC CCAACATTCA CTTGGATGCA GTGGTAGAG CTGGGNAAC TACACAAAGAA  
 ACCACACTGA TAATGGAGCG GCTAATACTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTCTAAGT GAACTACGT CACCCATCTC GACCCCTTC ATCTGTT  
 CCGAAATATG ATTAATAATG CAGACAAAGCT TCCCACATG TGATAAAGTC CCATTTGTG AATAACTCTT GTCTCAGTCA AAGCACCCAG TGGTGGTCC  
 CGCTTTTAC TAATTATTA CTCGTTGCA AGGGTATAC ACTATTCAG GTAAACAC TTATGAGAA CAGACTAGT TTCTGGTTC ACCACCCAG  
 GCGCTAACTA AGCGACCCCTG ACACCTCAAG TTGTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAGGC TCGTACTTCC TCGGACGAAG AAGGGGGCTT TTTGTGGT  
 CGGCTATTGAT TCGCTGGAC TGTGGACTTC AACAAAGTG AAACACTTTA AAAAATCCG AGCATGAGG AAGCTGCTTC TCGGCCCCG AAACACCAA  
 TTAGCCCCAAACCGGACG CCTGGATGCA ATGAACCTCC CAGCGACTAA TTATTTGATG TTTCCAGAA AGGCTCAGC CCCACAATGA TTTCTGGT  
 AATGGGGTGT TGGCGTTGCG GGACCTAGCT TACTTGGAC GTGGCTCATI AATAAACTAC AAAGGGTCTT TCCGAGTCCG GGTTGTTACT AAAGGAGCC  
 AGGTGGCCCA TGAGCACGAA TCCCCATCTT TTCTCCCTAG ATGTCGGCTA TCACCGGGAT CTTCTGGCT TGTTCGGCA CTGGGGTGGC ACACCCAG  
 TCCACGGGGT ACTCGTGTCT AGGGGTACAA AAGAGGGATC TACAGGGAT AGTGGCTCTA CGAACACGCA ACACACGGG GAAACCCACG TGTGGGCT  
 ATGATGCAAG CCTGTTGAA AGCGCTGATA TCACCAACAA GAATGGTATT TCTTCCCTCG CGTGGTGTGAA GAGTTCGGTG CGCATTACGT GCACGGGAA  
 TACTACGTG CGACAAACCTT CGCGACTAT AGTGGTGGTT CTTACCTAA AGAAGGGAGC GCCACAACTT CTCAGGCCAC CGCTAATCCA CCRFCCCGT

CAGGGTGGTA ACCGACCCGC TGACGGACTC GGGTAGGGCA GTGGTGGCG CCCTAACACA GCAGCTGGC CAGTACAACA CGCGAGAGAA CACCTTAC  
 GTCCACCAT TCGCTGGCG ACTGCTGAG CCCATCCCGT CACCAACCGC CGGATTGTGT CGTGGTACCCG GTCATGTTGT GGGGTCTCTT GTGGNAATCC  
 TTCCCCGGCT CGGATGGGT TGATGAGGCC GACCCGCTCA CGGCACCAAG CACCATCGA GTGGTGGCGA AGTGGCAGTT CGAGTCCGGC TACAGGACG  
 AAGGGGGGGA CGCTACGCCA ACTACTGGG CTGGGGAGT GGCGTGGCTC GTGGTAGCTT CACGACCGCT TCAACCTCAA GCTCAGGGCG ATGTCGGT  
 CCTCCCTGCC ACTGCTCATG GGGGGTTCC CCTTGATTI TTAGAAACCC TCCCGGACT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACACCCGATTA  
 CGAGGGACGG TGACGAGTAC CGGCAAAAGC CGAAACTAAA GAATCTTGG AAACCTTGGG AGGGGGCTCA GCTCCTTCC CAGTGTCAA TGGGGCTAAT  
 CCAGTTGTC CTCGGGAAA TCGTCCCTGGA CATEAACTCAC CAGGACCGA CGGCCAAACT CACCGGGCTC TCAACGGCC CAGGGGAGCT CGAGGGGGAG  
 GTCACCCAG GAGCCCTT ACCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCCCTGGCTC GGGGGTTGA GTGGGGCGAG AGGTTGGGG GTCGGCTCGA CCTCCGGCTC  
 CTCAACAAAGC TTTCATGCT TATGACGGCC GCCCCCCCCG CAACCGAACCA CGCCTACCAA ACCACCCCTC ACCACGGGCA CACTCTGGC GTTGTGGCTG  
 GAGTTGTTG AAAGTAACCA ATAGCTCCCC CGGGAGGGG GTCGGCTTGT CGGGATGCTT TGGTGGGGAG TGCTGGGGCT GTGAGAACGG CAACACCCAG  
 ATATTCCCCA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAAC ATTACAAACG GTGACATCTA CCAAGTTGTC CGGGGGCGCA CTTTCACCC  
 ATATTGGGCT AGGAGTCAAG CGGTGACTCT AGTACTCTGA CTTTCTTTG TAAATGTTGC CACTGTAGAT GGTCAACAG GGGGGGGCGT GAAAGTGGG  
 ACCATGTCCT GATCCATTGCT CGCTTATCT CGACGGCTGT GCCACCAACC CGTGGGGCTA CATTTCTAT ATCCGTCGAC TCAACGAAGG TCGCTCC  
 TGGTACCGA CTACGTAAAGC CGGAAATAGA CGTCACCCCA CGGTGGTTG CGACCGGGCAT GTACAAAGATA TAGGCACCTG AGTGGCTTC AGCGAGGAGA  
 GAACTTTTG CGGCATCCCC TGAGTCAAC CTCAGGTTCA CGCGTGTCTA CGGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATGGCAGG TACCCGGCCCG CGTGGACTCA  
 CTTGAAACAC CGCGTACGGG ACTCAGGTTG GAGTTCAAGT GGGGACGATT GGCACTCCAC GTGGACATGG GTAGGGCTC ATGGGGGGG CGACCTGAGT  
 ACCCAGATGG CTCCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGAA TGAGTTGGAT ATGGGACTG ATGCCAAAGA GATGGGGAC GACACCATCC TTGTGGACT  
 TCGCTCTACC GAGGIACTTG CTACTCCGATC TATAGCCGTT ACTCAACCTA TACGGTGTAC TACGGTTCT CTAGGGCTG CGTGGTACG AACAGCTAGA  
 CGGGGGGGGG CGGTCTGGT CGGACGGCTG CGGGGGGGTGC CGGATTTTGC CGAGGGGGAT CGCTATTCCC CGGTGATGCA CTTGGTCTCC  
 CGGGGGGGTGC CGGGAGGGG CGCAGAGCCA GGCTCCAGG CGCCCCAAC GCTAGAAAA CGTCACCTA CGCATAAGGG CGCACTACGT CAACACAGG

CCTCTGACGG CCCAGTGGG CCCAGAGCTT GATGTTGG ACCGCTATCG GCGCTGCATG AATATGGCA CCTTGACCGG CGCTCCGAAAG TTGGCCGCTA  
 GCACACTGCC GCTGCAACCT GGGTCTGAA CTACGAAACC TGCGGATAGC CGCAGGTAC TTATACCCCT GCAACTGGCC GCGAGGCTTC AACGGCCGAT  
 TCGAGCTGTT GCGGGGGCTC GAAAAGGCA GCGGTGCTC TTATGTTGGG CGAGTGGGGT ACCTGGGGG CAATGGGGAT ATGGATAATT CGATTCTTAT  
 ACCTCGACAA CGCGCCGAG CTTTCCGCT CGGGACCAAG AATACCAACCC CGTACCCCCA TGGACGGCCC TTGACGGCTA TACCTATTAA CGTAACAATA  
 TCGTTGGGG TTTGTCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTCAG GCTGGTGCCTC GTCTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGGGATGA GACCTGGCAC  
 ACCAAGGGCG AACAGGTCC TACCAACACCG ACCGACAGTC CGACCCACGAC CACACCAGGC GCTAAGGTTA GGAGTTAGAC TTGGCTACT CTGCAACGTC  
 AACGGCTATG CGCTGTTGAA TGCCATTGGG CTTGCTGCTG GTTCCACTT GGAGGTCACT CGATGACACA CGTTGTTCTC ATTGATAATC ACCATTCTT  
 TTCCGATAC CCCACAACCT ACGGTAACCC GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAGAG TAATGTTAG TGCTAAGAAA  
 TCTCTACAAAC CTGGTGGATG CGTTCCGCTT GGGCGCTTAT AAGTGCACCG TGTCCGGAA TACCGTGGCA CCTGACACCA TTTTGGCAGC CAACGGGGAC  
 ACAGATGTT GACCACTAC GCAAGGGCA CGGGCAATA TTACGTTGCC ACAAGGGTT ATGCCACCGT CAACCTTGGT AAAACGGCTC GTTGGCCCTG  
 CTGATCTGCC TTTCACCTGG ACCTGGTTAC CCTGGCGATG CGGGCAACAT GATGGCGCTG ATCGAGGCA CACTGGGGCA GATTCTTTA CTGGCTATT  
 GACTAGACGG AAGTGGACC TGGACCAATG GGACGGCTAC GCGGTTGTA CTACCGGAC TAGCTCCGCT GTGAGGGCTG TAATGGAAT GACCTACGTC  
 CGCTGGCTA CGAGGCACTC ATCGAATACC ACGGGGGCA GGTTGAGCCT TGTGGCCCTG TGCACGGCAC CACCGACAA ATGATCTTA CTGATGCAGC  
 CGGAGGGAT GGTCCGCTGAG TAGCTTATGG TGGCCGGCTT CCAACTCGGA ACACGGGGAC ACCTGGCGCTG GTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTC  
 TGTGCAGAGC CCTGTTTTC CAGGCTTTGC CACTGATGTT GAGGCTGATC ATTCAGAAGT CCCAGGGGGC AAGGTTCCAA TTGGCCGTTA TCACTCACTG  
 ACACGCTCG GGACAAAAAC GTCCAGAACG GTGACTACAA CTGGACTAG TAGCTTCTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACGGCAAT AGTGAAGTGA  
 CGCTGGCTGG TTGGCCGAGA CGGTATGAA TCATTGGCA CCTGTTCTC TGAGATGGT GATGTCATCA TGGGGCACG CACCAAGGAT CGAAAGGCCA  
 CGGACCCACC AACGGGGCTT CCCATAACTT AGTAACCCGT GGACAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACCGGCGTGC GTGGTGGCTA CCTTCCGCT  
 TTGGCCCTGCA GTTTCACCCCT GAGTCAGTGC TGAGCCAAAC GGGTCCATAC ATTTTGTCCC GCTGTCGCA ACAACTCTC CGGAACAAAT AAAAAGGATT  
 AACCGGACGT CAAAGTGGGA CTCACTCACG ACTCGGGTTG CCCAGGATAG TAAACAGGG CGACACAGCT TGTGAAAGAG CGCTTGATTA TTTTCCCTAA

TGATTGATGA CCTCTCCAGC AACACTGAAA CCTCTCAACG CCTACTTGGG TAACCCACT CCAACCCCTG AGGAGGCAAT TGAGGCTTC ACCGGCTGA  
 ACTAAGTACT CAAGAGCTCG TTGTGACTTT CAAGAGTTGC GGATGAAACCT ATTGGGTGA CCTTGGGACCC TCCCTCCGTTA ACTCCACAA CGGGCCACT  
 CGCTGGGCTA ATACGATGAC GTGCACATCG CAGGCTGCT TCCGACCATC CGTACTGGCG GTGAGGAGTT CGCTGATATT GCGGGGGCTG CCAAGGCATT  
 GGCACCCACT TATGCTACTG CACCTGTAGC GTGCGACCA ACCCTGGTAG GCATGACCGC CACTCGTCA CCGACTATAA CGGGCCGAC CGTTCCGTA  
 CCTGGGGGGG GCTCGTCCGT TCCGGATTAC TGGGGCAGGT TTGCTAGATT CGGCTGGCAC TGGTGGGAC CGTGCACAT CACCCACGGG  
 GGAGGGGGCG CGAGCAGGCA AAGGCTAATG ACCGGCTCCA AACGATCTAA GGGCACCCCTG ACCACCCCTG CCACGGTTGT GGTACTTGTG TGGGTGGGG  
 CCTTCCCTGA TGGCACCATC CGGTGGAGTC AAGCTGGCTA ACCACGGCA CGGTTCACTG AGCTCCAAGT CGGGTCCCG CGATGTCCTG GAGGGCGTGA  
 CGAGGGACT AGCGTCTAG CCCACCTCAC TTGACCGAT TGGTGGCTT GGCAAGTCAC TGGAGGTTCA GGGCAAGGGCG GCTACACGAC ATCCGGACT  
 ATATTCCCTT GGGCTTGAT GTGGATGCTG CTGGAAGTG GTTGAACCG TCCAACCTCA CCTTCCCTGTT CACACCTGGG TACAACCCCTG CGATTGGCCA  
 TATAAGGAAA CCCGGAACTA CACCTAGCAC GACACCTCAC CAAGCTTCCG AGGTGAAAGT GGAGGACAA CTGTCGACCG ATGTTGGAC GCTAACCGCT  
 TGTGCACCCG GTTCCGAGG CGCTGAAATT CCCACCCATC TTCAACACCC TTGACCGATT CCTGTCGGGG GGGGGGGGG AGGCTCAGAT CATGGGCTG  
 ACACGTCGGC CAAGGGTGC GCGACTTTAA GGGTGGTAG AAGTGTGGG AACCTGGTAA CGACAGGGCG CGGGGGGGCC TGGCAGTC GTCACCCGAC  
 GCGAACATGCA ATCATGGACA GCTCATGGCC GAGGCTTCC CGGACCTGGG CGGTACACGC CGGCTTGTG TGGATGGGC AGGACCCGAT GAGATGGCG  
 CGGTTACGGT TAGTACCTGT CGAGTAGGG CGTCCAGAAGG CGCTCGACCC CGCATGTCG CGCGAACAAAC CGTACCCGCG TCCCTGGCTA CTGACCGCT  
 TCCACGGCAC CACCTGGCTG TGGGAGCTTA AACAGACGG CACCATGGG CATTACACCA TCGAGGCTGA CGACCTGGG CTTGGGGCTT ACACCCCTG  
 AGGTGGGGTC CGGAAACCAAC ACCCTCGAAT TTCTTCTCCG GTGGTACCTC GAAATGTTAGT AGCTCAGACT CCTGGAACCG GAAACGGGCA TGCGGAACCT  
 CGATCTCGTG GGTGGCTCG GCACTGAGAA CGGGAGGCT ATGGCCGCTA CTTTCCGGGG CACGGGGCTT GATGACACCC CGATCCGCTT CGCTGGCTG  
 CCTAGAGCAC CCACCCGAGC CGTACCTCTT CGGGCTTCA TACGGGGAT GAAACGGGGCG CGGGGGGGGA CTACGTTG CACTACGGCA CGACGGCAGG  
 CGAGGTGGCA TGTCTATCT CAACGGGCA GTGACCTCT TGAAGGATGG TGCACAAAAG CGGCTTCCCT TGTGTCGGCA CGGGACCCACC CAGGCATGGT  
 CGTCCACGCT ACAAGATAGA GTGCGCTA CAGCTGAGGA ACITGGTACCG AGGTGTTTC CGGGAGGAGA ACCAACGGCT CGGGTGGTGG GTCCGTAACCA

TGCCCCAAGCA CGAAGAGATC GATTACTAG AAAAGGACTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGGCCACGG TCTTGGAAAG CATCGTGGAG GGTCGTCCGG  
 ACCGGTTCTGCT CTTCTCTAG CTAATGACTC TTTTCTCTAG AAGCTTACTG ATCATTATTA GACGGGTGCC ACAACCTTC CTAGCACCTC CCAGCAGGGC  
 GACACCTGGG CGAARATTCCG GCTCCGCATCG CTACCGTGGG TCTGGATGGG CTTCACAAAT CCACCCGCTC TCTGTTGAT TCCCTCAACC AGGGTAGGG  
 CTGTCGACCT CCTTTAACGG CGACCGTACG GAGTGCACCT AGACCTACCG GAGGTTTTA GGTGGGGAG AGACAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC  
 AGGGGGCGGT TTCATCATGG ACTGCAACTC CCCATCGCCT TCTTGGGAA TGATTCGTGA GCACTACCCAG CGGGGTGAAG TCGCTCGGT TACTCTCCG  
 TCCCCCGCGG AACTAGTACG TCACGTTAG GCGTAGGGG AGAAACCCCTT ACTAACCCACT CGTGTGATGCC GCCCCACTTT AGGGAGGCCA CATGAGACCG  
 TAGCGACGGG CAATTCGGT GCTGTCGGAG CGGGATCGT TTGGTGGGA TTACCGATCAC CTGGCTACCG TTGGCGCTAC CTCTCATCTT CGCGTGCCTG  
 ATCGTCCCGG CTTAAAGCA CGACACGCTC GGCCTAGCAA AACCCACCGT ATGCTAGTG GAGCGATGCC AACCCCGATG GAGACTAGAA GCGCACCGACA  
 GCAAAAGACTT CATCATGAT CCTGTCAGG TACGACCGGG CGGTTACTT GGTGCTGATC CCATCTGCT CATGCTCTCT GIGCTTGATG ATGAGAGATA  
 CGTTCTGAA GTAGTAACCA CGACAGGTCC ATCGTGGGGG CGCAATGAAA CCACCACTAC GGTAGGACGA GTACGAGAGA CACGAACTAC TACTCTCAT  
 CGACCCACTC GCTGCCGAGG CTGCCCCGTT TGATCTGGAT ATCCCTACCG AGGTTATTGA TGAGGAGGA GTCCCCCGGG CCATCAAGCT GGTCGCCAG  
 GCTGCGTGAG CGACGGCTCC GACGGGCAA ACTAGACCTA TAGGAGTGGC TCCAATAACT ACTCCCTCTT CAGGGGGCCG GGTAGTTGCA CCCACCGCTC  
 ATCTTGGG TGAAACCAACG CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTGGG TGCTTCACGT CGCCCTGTCA AGCTCATTCC AGCAGATGCC GTGCTCGTGT  
 TAAACCCCG AGTTGCTGC CGTGGACGTA CTAGACCGT AACCTAACCT AGCAAGTGCA CGGGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACCG CACGAGCACA  
 CTGAGTCTGG CGTGGCCGAT ACCGAAACCG TCCGCCACCT AGGTGGGAC TCGAATGCACT TTCTCGTTGG CTCCGAGCTG ACCAGCCAGG AACACGTCGA  
 GACTCAGACC GCACGGCTA TGGCTTGGC AGGGGTGCA TCCACCCGTC AGGTTACGTA AGGACCAACC GAGGTCGAC TGGTGGTCC TTTGCAAGCT  
 TCTGGCAGCC CGCGAATTGG TCTACGGCCC CAACAAAGTC TCGGGACTCA CCTCACCAAG TCGAGGACAA ACCGGCTCGCG CAGGGGTGCG GTGCTACGGC  
 AGACCGCTGG CGCTTAACC AGATCCCCGGG GTTGTTCAG AGCCCTEAGT GGACTGCTTC AGCTGCTGTT TGGCAGGCC GTGCCCCACG CGAGATGCC  
 GGGCTCATCT TCGAAGAGGC ATCCGCACGT AATGTTTCAC GTGAAACATC GCAAAAGATC ATCGCCCGAG AGCCCAACCT GCGCTACGTC GCGCTCAGCC  
 CCCGACTAGA AGCTTCTCGG TAGCGGTGCA TTACAAACTG CACTTGTAG CGTTTTAG TAGCGGGCTC TCGGGTTGGA CGCGATGCCAG CGCCAGTCCG

CTCCCACCTC CGGGTACAAG GATTTGCTTG TCGACGGCAT CTTCGGGTA CAAATCCACG CCCCACGCTCA GGGCAGGCTC GAGGAGAAA AGGCATTGAT  
 CAGDGTGGAG CGCCATGTTG CTAAACGAAAC AGCTGGCTA GAAAGGGCAT GTTACGGTGC GGGGTGACGT CGCGTCCGAG CTTCGTCTTT TCCGTAACCA  
 CGCCCCCGTT CGTGAAGAGG TTGGACGGCA GGTCCAGGTC TGGGGCGGA TCTGGATGTC CAGCCCCCTG GGGGCTGAG TGCCAGAGGG TGACGTCGAT  
 CGGGGGCGAA CGACTCTCC AACCTGGCT CCAGGCTCCAG ACCGGGGCGT AGACCTACAG GTCCGGGAAAC CCCCCACTTC ACCGCTCTCC ACTGCGACCA  
 AACGCTAACCTC TTGATGCCA TGAAGGTGG ACCGGGGAAAG TATTGACTG GGCTACGGTG CGGGGGCTG TGAAGGCARA GTCTTCTC CCGGGAGGCC  
 TTCGATTAG AACCTACGGGT ACTTCACCG TGGCCCTTC ATAAGCTGAC CGGATGCCAC GGCCGGCGAC ACTTCCGTT CAGAAACGAG CCCCCCTCGT  
 TCTCTCCGG AAACGGCTGG CAGGCACTCG CTGTTGGCTG CGCAGGTTTA GACATCACT CTGGCGTGG AATCCCCGCC GGTGCAGGCC CGTGGGGCTG  
 AACAGCCGCT GTTGGGACCC GTCCGTGACCC CACACCCGAC CGCTCCAAAT CTGACTTGA GACCGCACCT TATGGGGCGG CCACGTCGGT CGACCCCGAC  
 CGGGGAAGA TGGGGGGCGG CTGCTGAAA TTTTGGGAC CATTCTCCACA TTCCATTACT AAAGGTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAAA GAAAACCTGG  
 CGGGCTTCTC AGGGGGGGC GAGGACTTTT AAAAGGGCTG GTAGAGGTGT AAAGTAATGA TTCCAAATT TATCCTAGTA CTGACTTTTT CTTTGAACCC  
 CGGGCTCACCT GCATACTTCCG GTGAATTGG CGGGCAGGTC GTGGGGAAAT CCCTCTGCC TGTGCTCGAC CGCTGGAGA AGGCTCTCGT  
 CGGGGAGGTC CGACGATGGA CCTATGAAAC CACTTAAGCC CGGGCTCAAG CACCCGCTTA GGAGGGACGG AGGAGACGTC GTCCACCTCT TCGGGAAACCA  
 TGACCCGACC AACAGCCGAG AGTTCCGCC AGAACCTGGC GGCTACCTCC GCGATTATCT CGGGGGCCCA ACCGGCTGA CGGAATGCTC AACACCTCCCA  
 ACTGGCGTGG TTGTCGGCTC TCAAGGCCCT TCTTGACCCG CGGATGCCAG CGCTTAATAGA CGGGGGGGGT TGGGGGGACT GGCTTACGAG GTTGGAGGGT  
 CTGGCAGGGG AAGGCAAAAGG CTGGGGGGG ATCTCTCTA AGGGCGAAGA CCTGTCACCG GGGGGTGAC ACACCCCTAA CGACGGTACG GGGCAGGCTG  
 GAGGCTCCGC TTCCCTTCC GAAACGGCCC TAGAAGGAGT TCGCCCTCTC GGAGGAGGTG CGGCCACGTC TGTGTTGATT GGTCCACTAG CGGCTCCACG  
 TGCTTGCCTA CGGCATGGGC AAAACCCGCA TCACTGCCAGA GACCCGGCA GGGCAGGACG GCACCCGAC CGCTCTGCCA TGTGGGCTCA TGGGGCTCGA  
 AGGAACGGTT CGCGTACCCG TTTTGGGGGT AGTAGCGCT CTGGGGGGT CGCGTCCGTC CGTGGGGGTG GCGAGACGGT ACACGGCAGT ACCGGGAGCT  
 CGGGCTTGTG TACATGGGG CCAAGGAGCT TGGGGGGAG CAGGGCAACG TCTACCGCAT GCACGTCAC GGGGGAGG TCAATCCCCGT GGAATCTGCT  
 AACGGCAACAG ATGACCCGG GGTCTCTCA AGGGGGCTC CTGGGGTGC AGATGGCGTA CGTGGACGTC CGGGCTTCC AGTAGEGGCA CCTTAGACCA

特開昭62-244382(5)

TCCGGCACCC TGAAGGACCC CGTGAATGAA CGCGCTGGCG ATTGGACCCG AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGGCCCC GGGGGGGGG  
AGCCCCGGG ACTTCTCGG CCACTTAATT CGCGACGGCG TAACCTGGG TTGGAAGGTG CTCAGGGTGA TGGAGAGACCC GTGGGGGGGG CGGGGGGGGG  
CATTCCTAAC CTCGTCGCGT GAATTCCACA AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AACGCACAGA TGCTAGAGCC CACCCGGCAAG CTTCGGGACG TTGTGGGCG  
CTAACGGGTC GTAGCACCGA CTTAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTCGG TTCCCTGTCT ACAGATCTCGC GTGGGGGTTC GAAGGGCTGC AACACAGCG  
CTGTGTCGGT GGTGGCTCCA ACGCCATCGG CATGTTGGCA GACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTGGGGGCTG AGCCAGGGGG TGAAGGGCTC  
GACACAGCGA CCACCGAGGT TGCGGTAGCC GTACAGCGT CTGAACTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGGAC TCGGTGGGCC ACTTCCGGAG  
CACTCCGGCA ACCACGGGGC AACCATCACC AACGGTCAGA TCGGCATCTC GCACCCGACC CGTTCTACC TGATGGCAA CTCCGACGGC CAAGTGGAG  
CTGAGGGCGT TCGTGGCGG TTGGTAGTGG TTGCGAGTCT ACAGGTAGGA CGTGGGTGG GCAGGGATGG ACTACGGCTT GAGGCTGGCC GTCACCTTC  
AGTCCTACTC CATCTCCGCC CGACTTGATT ACCCAGGGT CCGCCACAGC ACCCACACCT GCACCCGACC GGGGGCACT ACCTTCTAT CACCGAGCG  
TCAGGATGAG GTAGAGGGGG CCTGAACTAA TGGGTGGCGA CGGGTGTCTG TGGGTGTGG CGTGGGGTGG CGGGGGGTGA TGCACCCATA GTGGCTGGG  
GAGGCCCTCC AAGCATTCCA GTAGGCTCGG CGCGTACGAA GGCATCATCG CGCGCACTGG ATCTCTCACR CGGGTTCCCG TACGACTCAA CGGGGCCAAAG  
CTTCGGGAGG TTCTGTAAGGT CATCGGAGCG CGCGATGGCTT CGGTAGTAGG CGCGGTGACC TTAGGAGTGT CGCGAAGCGG ATCTGAACTT CGGGGGCTCC  
ACCGGGCAAG AGGAAGGCCA GAACTAACCC ATCTCTGT CCCTATCCGG CGGTGGGAC AAGGACGGT ACCATCGGC CGGCACCCCTC GAAAGAAAATC  
TGGGGCTTC TCCTTCCGGT CTTGAATTGG TACGACCGC CGGATAGGG CGCACCCGCT TTCTGCAAC TGCTAGGGGG CGCGTGGGAG CGTCTTTAG  
CAGAAGTGT CCTGAAAGGAC AACCGATGAG CGCTTAEGAC GATCTTTTG CGGACCCCTC GACAGGTCA GGGGAGGGGG CTTTGTCC CTTCATCATG  
CTCTTACTA CGACTTCCGT TTGGCTACTC CGCAATGCTG CTAGAAAAAC CGCTGCGGAG CTGTGCCAGT CGGTACCGT ACCTGAAACC GCATGAAAG AGGCTGGCTAC  
CTGAGGCCAC CTTCAACAGA CGAGGCTTTC CAGATCATCT CGCACCAAT CGAACCTGGC CGACATGCC TGAACTTCC CGTACCTTTC TCCGACCCAG  
GACTCGCTGG GAAAGTGGTCT CTCGAAAG GTCTAGTGA GGTGCGTGT CGTGTACCGT ACCTGAAACC GCATGAAAG AGGCTGGCTAC  
TTGCCGATGG CGCCACCGTC CGGGGANTCCC ACETCCGGC ACTCGACGGC GGCGCCACCG TAGACAGGCC ACTCGAGCAG ATCAAGGCC TGGGCCAGC  
AACGGCTACC CGGGTGGCAG CGCCTTAGGG TGAGGCCCC CGGGGGTGGC ATCTCTCGG TGAGCTGGC TACTTCCGTC TACTTCCGTC AGGGGGCTCC  
CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAC CTTCTTCA CGGGTGGCTT GGATGGCTTC TACCAAGAGT TCGCTGAAGC TGGGGGAGAC  
GATGGGTCTC CAAGGGTAGC CTTACCGAGTA GATGCCGTG CAAGGAAAGT CGGCACCGAA CCTACCGAAG ATGGTCTCA AGCGACTTCG ACCGGCTCTG  
TCCATCCTCC TCCCAGACGT CCCAGTCGGC GAAGGGCCAC CGTTTCTGC ACCACCCGGG GTTCATCCCA TTACATCGC TCCGGCCAAAC CGCACGGAGA  
AGGTAGGAGG ACGGTCTGCA CGGTCAAGGG CGTCCGGCTG CGAAAAGACG TCGTCGGCT TAACTAGGGT AAATGTAGCG AGGCGGGTTG CGGTGGCTCT  
AAACCCCTGCA CGGTGTCTCC CGCGCATCAA AGGGCTACAT CTACCCATC TCCCGCGACG CGGTACCCGG CACCGAACGT GAATCATCCA CGACGGGCT  
TTGGGAGCT CCCACAGAGG CGGGCTAGTT TCCCGATGTA GATGGGTAG AGGGCGTGC CGCAGTGGCC GTGGCTTGCA TTAGTCCGGT GGTCGGCCGA  
GTCCGGAGTC GTGGACACACA TCAAGAAATT TGATGGCCA CCCATCCTCT TGGGCTTCGG CGTCATCATCC CCTCAGCAGC TGGCAGACCC GATTGGACCG  
CGGGCGTACAC CACCTGTGT AGTTTTAA ACTACGGCTT CGGTAGGAGA ACCCGAAGCC CTGCACTAGG GGACTCGTGC ACCGTCTGGC CTACGTCG  
GGTGGCTTCCG CGTCGATCAC CGGTTCGGG ATCACCAAGA TCATGGCTTC CCACGGGAA CGTAGGACCC CGAACCCCTC CACCATCGA GATATGGACG  
CCACGAAGGC CACGGTAGTG CCCAAGGGCC TACTGGTCT ACTAACCGAG CGTGAACGTT CCACCTGTGG GCTTGGGAG GTGGTAACCT CTATACCTGC  
GTTTGAAGA GGATCTCACT GAGTTCTACT CTGGGACTGAG AGGCACGGAC CAAGAAGGTT TAGCCCTTTA AAATGGCAA TGTTCAGCT GAAGACATTG  
CAAACCTCTT CCTAGAGTGA CTCAAGTGA GACGCTGACT TCCGTCGGTG GTTCTTCAA ATCCGGAAAT TTACCGTT ACAGTGGCA CTTTGTAAAGA  
GAGACAATGT AGAAACATCA AGAAAGCCAC CTCTTAGCTC TCGGGCTGGG AGGGGGCTTC TTGTGTTGGG GTTAGGAAA TCTCAGGGTT TTGGAGATCT  
CTCTCTTACA TCTTGTAGT TTCTTGGTG GAGGATCGAG AGGGGGACCC TCCGGGAGAG AACACACCG CAAATCTTT AGAGTCCCAA AACCTCTAGA  
TAGCTTGGAG CGGGCTGGGT AGGAGGGCCC CGGGGGAGGGAG CAATCTTAGG CTAGGTCCGA CGCCCGAGGG TTGGAGTGGC ATCACGGTCC CGCTTCCG  
ATCGAACCTC CGCCACCCCA TCCCTGGGG CGGGCTCCCTC GTAGAATCC CATCAGGCT CGGGGTGGCC AACCTCACCG TACTGCAAGG CGGAAGAGGT  
CGGGCCTACG CTTEGGAGCT GGATCC  
GGGGGGATGC CAACCCCTGCA CCTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域による群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNAが人工的に合成されたDNA又は微生物に由来するDNAである特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレビパクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレビパクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNAが1部置換、変異又は削除されたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNAがプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNAである特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNAを用いるレートリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中A アラニン、C リステイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P アロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリプトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)。

## 第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPVVFSL DVRYBEDASA LFAHLGGTTA DDAALLESAD ITTKNGISSL AVLKSSVRIT CTGNTVVVTOP LTDSGRAVVA RLTQQLGOYN TAENTFSPPA									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDVERERL TAPSTIEVLR XLOFESGYSD ASLPLLMCGF AFDPLETPET LPAVEESVNT YPDYOFVLAE IVLDINHQQD TAKLTGVSNA PGELEAELNK									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLTDAALP ATEHAYQTTP HDGDTLRVVA DIPDAQFRTO INELKENIYN GDIYQVVPAR TFTAPCPDAF AAYLQLRATN PSPYMFYIRG LNEGRSYELF									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GASPESHLKF TAANRELQLY PIACTPRPCL NPDGSINDEL DIRNELDNRT DAKEIADDTH LVDLARNDLA RVSVPASRRV ADLLOVDRYS RVMMHLVSRVT									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLQPELDAL DAYRACHNMG TLTGAPKLRQ MELLRGVEKR RRGSYCGAVG YLRGNGMDM CIVIRSAFVQ DGVANVQAGA GVVRSNPOS EADETLLKAY									
510	520								
AVLNATLAA CSTLEVIR									

## 第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTHVVLIDNH DSFVYNNLYDA FAVAGVKTV FRNTVPVETI LAANPDLCI SPGPYPADA GNMALIERT LGQIPLLCIC LCYQALIEYH CGKVEPCGPV  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 HGTTDWMLT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPGRKVPI GRYHSLCCVV APDGIESLGT CSSEIGDVIM AARTTDGKAJ CLOFHPESVL SPTGPIILSR  
 210  
 CVEBOLLAN\*

## 第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTSPATLKV LAYLDNPTPT LECATEVPTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RCEOFADIAA AAKAFLAAAR PFPITGAGLL DSAGTGGDGA NTINTTGAJ  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 LIAASCGVKL AKHGNRSVSS KSGSAVLEA LNIPLGLOVD RAVKWFASN FTPLFTPAYN PAIAHVPVRA QALKPPTFN TLGPLLSPAR PERQIMGVAN  
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 ANHCOLIAEV FRELGRTRAL VVHAGTDEI AVHGTTLVWE LKEDGTIEDY TIEPEDLGLG RYTLEDLVCC LTCENAEAMR ATFACTCPDA HRDALAASAC  
 310 320 330 340 350  
 AMPYLNQDVD SLKDGAOKAL SLLADATTOA WLAKHEEIDY SEXESSND\*

## 第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTSNNLPTVL ESIIVEGRGH LEEIRARIAH VDVLALPKST RSLFDLSNQG RCGARFIMEC KSASPSLGMI RENYQPGELA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 GDYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIDPVQVR PARYFGADAI LLMLSVLDE EYDALAAEAA RFDLIDLTVE IDEGEVARAI KLGAKIFGVN HRNLHDLISID  
 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 LDRSRRLSKL IPADAVLVSE SGVRDTETVR QLGQHNSAFL VGSQLTQEN VOLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAQTARAA GAVYGGGLIFE EASPRNVSRE  
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 TSOKIIIAEP NLRYVAVSRR TSGYKOLLV DGFAYQJHAP LOCSVEAEKA LIAAVREEVG PQVQVWRAIS MSSPLGAZVA ECDVDKLILD AHEGGSGEVF  
 410 420 430 440 450 460 470 480  
 DWATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAQALAV CGACGLDINSG VEYPAGACTW GWGCRCCRRAA ENFRDHLHIP LLKV \*

## 第 6 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MTEKENLCCG TLLPAYPGEF CGGOFVAESLL PALDOLEKAF VDATNSPEPR EELGGYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLACECK GFAKIFLXRE DLVHCCAHKT  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 NOVIGOVLLA KRMGKTRIIA ETCAGQHCTA TALACALMCL ECVVYMGAKD VARGOPNVYR MOLHGAKVIP VESGSGTLKD AVNEALRQWT ATFHESHYLL  
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 GTRAGPHPPF TIVREFHKVI SEEAKAQMLE RTGKLPDVVV ACVGGGSNAI GMFAADFIDDE GVELVGAEPA GEGLDSGKNG ATITNGQIGI LNGTRSYLMR  
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
 NSDCQVEESY SISAGLDYPC VGHSTHTCTP PARTTLVSPT PXPSKHSSSL ARVEGIIIPRT GILTRVRLRL KRAKTAEEBG QNLTILVSLG CRGDKDVKDHR  
 410 420  
 AGTLEENKPEL ILKONR

## 第 7 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 MSRYDDOLFGD ASTRSGEGAF VPFIMLSDPS PEEAFQIIST AIERGADALE LCVPPFSDPVA OGPTVAESHL RALDGGATVD SALEQIKHVR AAYPEVPIGM  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 LIYGNVPFTR GLDRFYQDEFA EAGADSIILP DVPVREGAPP SAAAGIDPIY IAPANASEKT LECVSAASKG YIVAIISRDGV TGTERESSSTD GLSAVVVDNIK  
 210 220 230 240 250 260 270 280 290  
 KFDGAPILLG FGIISSPQHVA DATIAGASGA ITGSAITKII ASHCEGENPW PSTIRDMDGL KKDLTEFISA TEGSDDEGLG L

- 11) アミノ酸配列が一部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。
- 12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。
- 13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。
- 14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。
- 15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアティニエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。
- 16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるレトロプロト

アンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌 (Coryneform bacteria) は、バージース・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bargy's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版 599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

プレビバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC 14066
プレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC 14068
プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム	ATCC 13869
プレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
プレビバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
プレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	ATCC 13032, 13060
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム  
ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニュエーター、さらにリーダーベブチドをコードする領域 (*trpL*)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (*trpD*)、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (*trpB*, *trpA*)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

し（例えば H. Saito and K. Miura *Biochem. Biophys. Acta* 72, 619 (1963) の方法が使用できる。）、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離（クローニング）できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、巾広い種類の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその一部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくは *E. coli*、*B. subtilis*において増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- (1) pAM 330 特開昭58-67699 参照
- (2) pAM 1519 特開昭58-77895 参照
- (3) pAJ 655 特開昭58-192900 参照
- (4) pAJ 611 同上
- (5) pAJ 1844 同上
- (6) pCG 1 特開昭57-134500 参照
- (7) pCG 2 特開昭58-35197 参照
- (8) pCG 4 特開昭57-183799 参照
- (9) pCG 11 同上
- (10) pCC 1 特開 (Mautin/Ajico)

(11) pBL 100 特開 ( )  
 (12) pBR 322  
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴスクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシュエリヒア・コリK-12について報告されている様な (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

プレビバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株 (I. Shio, H. Sato, M. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、プレビバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

法、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153(1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に (Chang, S. and Cho, S. N., Molec. Gen., Genet., 168, 111(1979); Bibb, M. J., Hard, J. M. and Hopwood, D. A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Prink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のバチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得ることができると、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株 (I. Shio, S. Sugimoto, M. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、プレビバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アグセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、9-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株 (H. Haga, M. Nakagawa, Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975)) 等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成濃積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に応じアミノ酸、ピタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好気的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファンの生産蓄積が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、プレビバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えは、インタ

ーフェロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが繰用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるレートリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニュエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合せた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異なるように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びレートリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むプレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるレートリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

#### 実施例 1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

##### 1-1 プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225(PERM-P4370)を1ℓのCMC培地（ベブトン1g/ℓ、酵母エキス1g/ℓ、グルコース0.5g/ℓ、及びNaCl 0.5g/ℓを含み、pH7.2に調整したもの）に植菌し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDSで溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に3.5mgのDNAを得た。

##### 1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとしてpAJ1844（分子量5.4メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するプレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037を100mLのCMG培地に接種し、30℃で対数増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心により上清を得た。フェノール処理のち、2容のエタノールを加えてDNAを沈殿回収した。これを少量のTEN緩衝液(20mMトリス塩酸塩、20mM NaCl、1mM EDTA(pH 8.0))に溶解後、塩化セシウム-エチジウムプロミド密度勾配平衡遠心によりプラスミド画分を分離し、最終的にpAJ1844プラスミドDNA約200μgを得た。

### 1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 1.0μgと1-2で得たプラスミドDNA 5μgとを制限エンドヌクレアーゼPst Iでそれぞれを37℃で1時間保持し、切断した。65℃で10分間加熱した後、両反応液を混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、T4ファージ由来のDNAリガーゼによって10℃に24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5Mシューカロース、20mMマレイン酸、20mM塩化マグネシウム、3.5%ベナッセイプロス(Difco)からなるSMMP培地(pH 6.5)0.5mLで洗浄した。次いで1.0mg/mLのリゾチームを含むSMMP培地に懸濁し30℃で20時間プロトプラス化を図った。6000×g、10分間遠心分離後、プロトプラスをSMMPで洗浄し0.5mLのSMMPに再度懸濁した。この様にして得られたプロトプラスと1-3で調製したDNA 1.0μgを5mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリコールを最終濃度が30%になる様に添加した後、DNAをプロトプラスに取り込ませるために室温に2分間放置した。このプロトプラスをSMMP培地1mLで洗浄後、SMMP培地1mLに再懸濁し、形質発現のため、30℃で2時間培養した。この培養液をpH 7.0のプロトプラス再生培地上に塗布した。プロトプラス再生培地は蒸留水1mLあたりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン1.2g、KC1 0.5g、グルコース1.0g、MgCl2·GH2O 8.1g、CaCl2·2H2O 2.2g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈殿を採取した。

### 1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのアンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株No38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠損株No30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した)をDNA受容菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストランスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を5mLのCMG液体培地で対数増殖期の初期まで培養し、ベニシリングを0.6ユニット/mL添加後、さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により固体

ペプトン4g、粉末酵母エキス4g、カザミノ酸(Difco社)1g、K2HPO4 0.2g、コハク酸ナトリウム1.35g、寒天8g及びクロラムフェニコール3μg/mLを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニーが出現してきたのでこれを最少培地(2%グルコース、1%硫酸アンモニウム、0.3%尿素、0.1%りん酸二水素カリウム、0.04%硫酸マグネシウム7水塩、2ppm鉄イオン、2ppmマンガンイオン、200μg/Lサイアミン塩酸塩、50μg/Lビオチン、カザミノ酸(Difco)3g/L、クロラムフェニコール10μg/mL、pH 7.0、寒天1.8%)にレブリカし、クロラムフェニコール耐性でかつトリプトファン要求性の消失した株をAS60を用いた区分から2株、No38を用いた区分から1株、No30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、いずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、N<sub>o</sub>38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、N<sub>o</sub>30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

#### 1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851をN<sub>o</sub>38に、ptrpB301をN<sub>o</sub>30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4、にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンターゼ

βサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地土でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

#### 1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

#### 実施例2

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング  
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムAJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性のN<sub>o</sub>1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI或いはSalI、又はXbaIで完全に切断し、*E.coli*のベクターpUC18(Messing,J.,et al.,Gene,33,103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、*E.coli* JM109(Messing,J.,et al.,Gene,33,103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside),IPTG(isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンビシリソを含むし寒天培地にブレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(*trpE*)を有するptrpE36の1.2kbのPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼイション(Grunstein,M.,Walls,J.:Methods in Enzymology,68,379,Academic Press Inc.,New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロー

ンを得た。BamHI区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。

その結果、ptrpE97はptrpE36、ptrpE42、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及びptrpB301のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

#### 実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリシン酸シンターゼ遺伝子(*trpC*)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(*trpA*)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較から*trpD*遺伝子と*trpB*遺伝子の間に*trpC*遺伝子が、*trpB*遺伝子の下流に*trpA*遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

### 3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド ptrpE97 から第1図に示した約2 kb. の SstI-EcoRI断片を分画し、SstI, EcoRI で切断した pUC19 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. の SstI-Hind III断片を分画し SstI, Hind IIIで切断した pUC18 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, rpsL8, λ<sup>-</sup>) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いは SstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coli の要求性を消失させた。

### 3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド ptrpE97 から第1図に示した

約2.4 kb. の NruI-BamHI断片を分画し、SmaI, BamHI で切断した pUC18 に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No 5644 (trpA33, rha-7, λ<sup>-</sup>) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

### 実施例4

#### トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られた ptrpE36、ptrpD3851、ptrpB301 及び実施例2で得られた ptrpE97 を有する形質転換株から各々プラスミドの調製を行った。各々のプラスミドの挿入DNA断片について pUC18 或いは pUC19 又は M13mp10 (Messing, J. and Vieira, J., Gene 19, 269 (1982)) を用いる dideoxy chain termination 法 (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示すDNA塩基配列が得られ、この塩基配

列はプレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要なRNAポリメラーゼの結合部位 (trpプロモーター)、リボソームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-イントドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) に対応するDNA配列、及び停止配列 (ターミネーター) を含むことが判明した。

又、プロモーターと trpE構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッショングに関与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アティニエーションに関与するリード-ペプチド (trpL) をコードする領域とアティニエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された (第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

### 実施例5

#### プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、ptrpE97、或いは ptrpE36 の EcoRI-Hind III断片 (約550 bp.) を E. coli のプロモーター-プローブベクター pKK175-6 (アンビシリン耐性 (Ap<sup>r</sup>)、テトラサイクリン (Tc<sup>r</sup>) 感受性) (Brosius, J., Gene 27, 151 (1984)) にサブクローニングした。得られた組換えプラスミド ptrpP01 は E. coli 中で Tc<sup>r</sup> 耐性を発現した。

さらに、pAM330 由来のトリメトブリム耐性のベクター、pAJ226の PstI切断部位に PstIで切断した上記組換えプラスミド ptrpP01 を連結し、プレビバクテリウム AJ11225 を形質転換したところ Tc<sup>r</sup> 耐性の発現が認められた。この組換えプラスミド ptrpP02 を有する形質転換株の Tc<sup>r</sup> 耐性度は第1表に示したように、Trp<sup>r</sup> 存在下では Tc<sup>r</sup> に対する感受性が増した。従ってこの領域には、プロモーターとオペレーターが存在すると考えられる。

第1表 カザミノ酸を添加した最少培地におけるテトラサイクリン耐性度及ぶクロラムフェニコール耐性度

テトラサイクリン耐性度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	トリプトファン無添加		トリプトファン添加 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	AluI	HindIII	AluI	HindIII
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0	600 <	600 <
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentans</i>	2.5	5	600 <	600 <
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0	4.0	200
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	2.0	2.0	—	—
クロラムフェニコール耐性度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )				
ptrpP05 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	—	—
ptrpP06 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	—	—
PE803STR* in <i>E. coli</i>	4.0	—	—	—

\*PE803STRは*E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミド $\text{pAJ234}$ を用いて、レートリプトファン生産について検討した。

$\text{pAJ234}$ を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムM247を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られたAJ12195(PEM-P8014)を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地(グルコース13.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 g、マル酸1.2 g、酢酸3.0 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、 $\text{MnSO}_4$  7.0 g、 $\text{MgSO}_4$  7.0 g、d-ビオチン5.0  $\mu\text{g}$ 、サイアミン塩酸塩2000  $\mu\text{g}$ 、メチオニン4.0 g、チロシン6.5 g、大豆蛋白酸加水分解液「味液」5.0 g、 $\text{CaCO}_3$  5.0 gを水1 Lに含む、pH 6.5.) 2.0 gを5.0 gの坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中のレート

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII断片をAluI或いは、HaeIIIで切断し、各断片をpKK222上にサブクローン化した(第5図)。その結果AluI-HindIII断片(51bp.)及びHaeIII-HindIII(135bp.)上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモーター-プローブベクター $\text{pKK232-8}$ (Ap耐性、クロラムフェニコール感受性)を用いて得ており、AluI-HindIII断片(51bp.)上にプロモーターが存在することを確認した。

#### 実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子( $\text{trpD}$ )、N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子( $\text{trpC}$ )、トリプトファンシンターゼ遺伝子( $\text{trpB}$ ,  $\text{trpA}$ )の增幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングしたプレビバクテリウムラクトフェルメンタムトリプトファンオペロンのうち $\text{trpD}$ ,  $\text{trpC}$ ,  $\text{trpB}$ ,  $\text{trpA}$ の4遺伝子を有する組換えプラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)ATCC 8042を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株のレートリプトファン蓄積量

菌株	レートリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/d
PEM-P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/d

尚、M 247を得るために寄託されたAJ 12195より宿主細胞を損うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失なわれることもあるし、「除去」操作によって除くことができる(Bact. Rev., 36, p361-405(1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195をCMG液体培地に接種し、37℃で一晩培養(高温処理)後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しないCMG寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクロラム

フェニコール感受性株として分離される株が  
1247である。

#### 4. 図面の簡単な説明

## 第1図 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図

第2圖

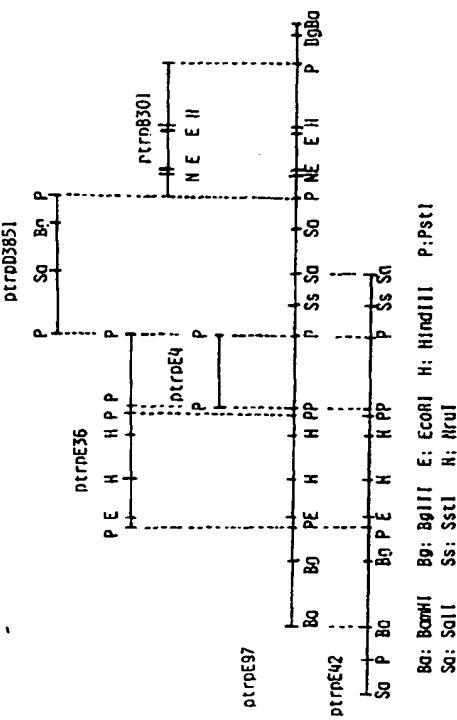
# プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18, pUC19或いはM13mp10にクローン化し、矢印で示した方向へ、dideoxy法により塩基配列を決定した。

第3回

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンの制御領域  
-ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
trpE構造遺伝子の5'上流域の塩基配列並びに  
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

四  
1  
箇



## RNA の 2 次構造 -

第4回

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、  
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

355 四

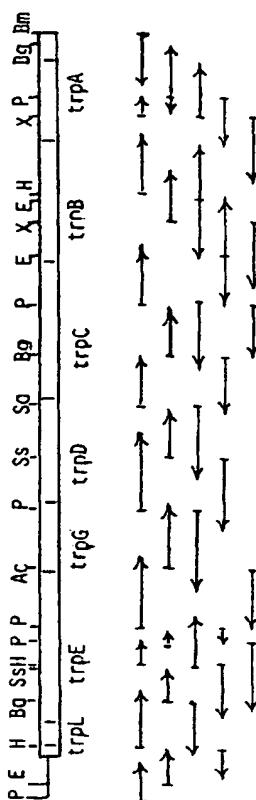
プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの  
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、  
オペレーター領域の限定のための戦略  
-35 及び -10 は *E. coli* のプロモーターコンセン  
サス配列の -35 、及び -10 領域に相当する領域  
を示す

### 第 6 図

# プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの トリプトファンオペロンのターミネーターの構 造

特許出願人 味の素株式会社

四

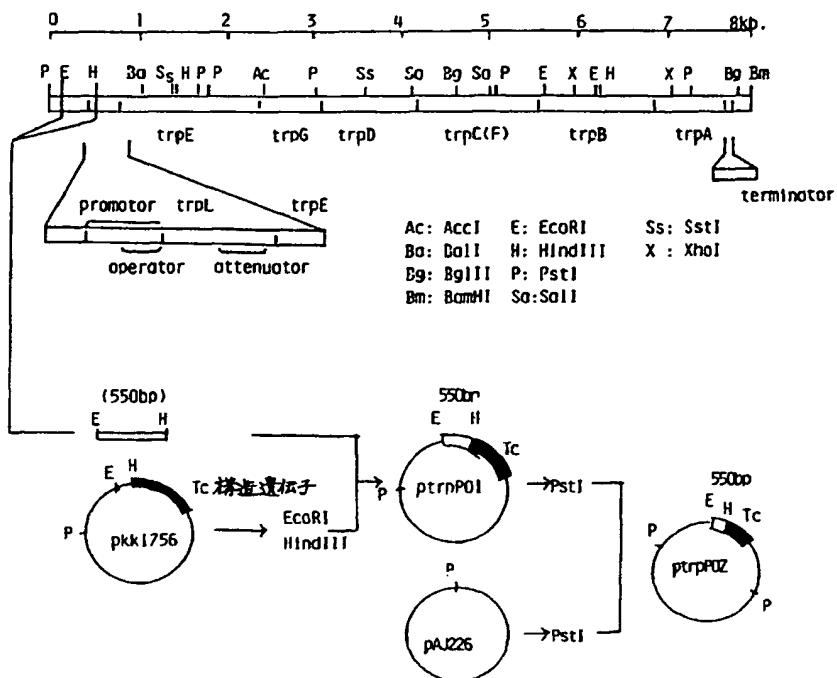


3 図

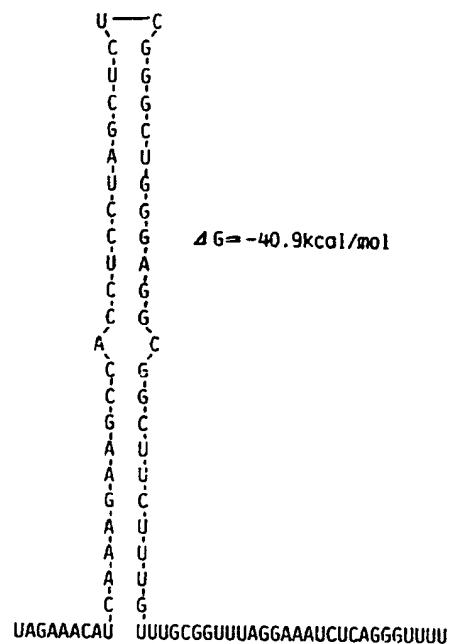
-35 -10  
 TACACAAAGACCCAAAATGATTAATATTGAGACAAGCTCCACTATGATTAAGTCCCATTGGTGAAT  
 AspSerCysLeuSerGlnSerThrGln**TTTPTT**ArgGlnAsn\*\*\*  
 AACTCTTGTCTAGCTAAAGCACCAGTGGTGTGGGGCTRACTAGCGAGCTGACACCTCAAGTTGTT  
 TCACTTGTGATTTTAAAGCTGACTTGTGAGGAAGAAGGGGCTTTGTG66TTTTAGCCAC  
 AACGGCAAGCCCTGATGATGAGCTCGAGGGATAATTATGATGTTCCAGAAAGGCTTAGGCC  
 CACATGATTTCACGGTAGGGTGGCCCATGAGCACGAAT  
 MetSerThrAsn  
 MetSerThrAsn  
 TPE

四  
五  
卷

#### 第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 4  
// C 12 P 21/02  
(C 12 P 13/22  
(C 12 R 1:13)  
(C 12 P 13/22  
(C 12 R 1:15)

識別記号 厅内整理番号

6712-4B

## 手続補正書

昭和61年6月3日

特許庁長官印

## 1. 事件の表示

昭和61年特許第87600号

AED

## 2. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされるペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子  
発現利用方法及びトリプトファンの製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目5番8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 次山勝弘

## 4. 補正命令の日付 自発

以上

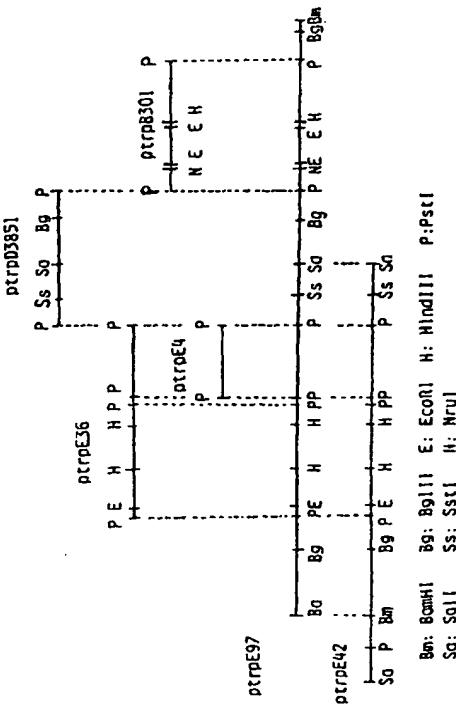
## 5. 補正により増加する発明の数 なし

## 6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

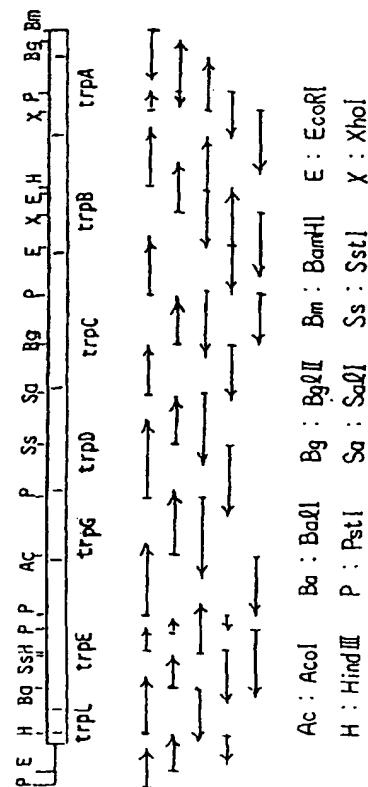
および図面(第1図、第2図、第4図)

6.4  
特許庁長官印

第1図



第2図



第 4 図

